



Estudio de los endófitos presentes en las raíces de *Posidonia oceanica* y su capacidad antagonista frente a *Pythium aphanidermatum*.

Master en Horticultura Mediterránea bajo Invernadero

Autor:

Jose Miguel Peral Fernández

Directores:

Dra. Milagrosa Santos Hernández

Dr. Fernando José Diánez Martínez,

Septiembre 2016

Estudio de los endófitos presentes en las raíces de *Posidonia oceanica* y su capacidad antagonista frente a *Pythium aphanidermatum*.

J.M. Peral-Fernández¹, M. Santos-Hernández¹, F. Diánez-Martínez¹.

¹ Universidad de Almería, Almería, España.

Abstract

A small group of submerged marine macrophytes, seagrasses, were reported lack to mycorrhizae. On the other hand, several authors detected fungal endophytes in seagrass leaves, shoots, rhizomes, and roots, and an anatomically and morphologically unique dark septate endophytic (DSE) association has been recently described in the roots of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. In this study, for the first time, the identification fungi present in roots of the *Posidonia oceanica* was estimated. Moreover in vitro experiments evaluated the effect of isolates to fungi species present in roots of *P. oceanica* were tested against *Pythium aphanidermatum* was carried out. A total of 15 fungal taxa, mainly belonging to *Ascomycota*, were identified by macro and microscopic methods. The most represented family were *Pleosporales*. The results show that antagonistic capacity of *Gliomastix* sp., *Papulaspora* sp. *Cladosporium sphaerospermum* had the higher antagonistic activity than the other fungi isolated from the roots of *P. oceanica*.

Keywords: Mediterranean Sea, Seagrasses, Marine fungi, *Pleosporales*, Growth inhibition,

Resumen

Un pequeño grupo de macrófitos marinos sumergidos, las fanerógamas marinas, han sido descritas como organismos sin asociaciones micorrícicas. Por otra parte, varios autores detectaron hongos endófitos en hojas de algas, brotes, rizomas y raíces, y una asociación anatómica y morfológica de hongos endófitos septados oscuros (DSE) ha sido recientemente descritas en las raíces de *Posidonia oceanica*. En este estudio, se aislaron los hongos presentes en las raíces de *P. oceanica* y se evaluó in vitro la capacidad antagonista frente a *Pythium aphanidermatum*. Se aislaron un total de 15 grupos taxonómicos, pertenecientes al orden *Ascomycota*, que fueron identificados mediante procesos macro y microscópicos. La familia con mayor representatividad fue *Pleosporales*. Los resultados de capacidad antagonista muestran *Gliomastix* sp., *Cladosporium sphaerospermum* y *Papulaspora* sp. presenta la mayor actividad antagonista de los hongos aislados de las raíces de *P. oceanica*.

Palabras clave: Mar Mediterráneo, Praderas marinas, Hongos marinos, *Pleosporales*, Inhibición del crecimiento.

INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas marinos los hongos y microorganismos juegan un papel transcendental. Estos ecosistemas albergan una gran biodiversidad de los mismos, siendo su composición, específica de cada hábitat, además de jugar un rol importante desde el punto de vista de la ecología, agronomía y biotecnología.

Los conocimientos básicos sobre la distribución y la función ecológica de los hongos marinos son aún escasos. Estos hongos abarcan un amplio rango de saprofitos, parásitos, simbioses, endófitos y epífitos. Se pueden encontrar en todos los hábitats marinos, en los que se incluyen, comunidades planctónicas, plantas, invertebrados, vertebrados y materia inorgánica (Jones 2011a).

Se ha estimado que los hongos marinos superan 10.000 especies/filos, a pesar de que muchos ecosistemas marinos han sido pobremente investigados (Jones 2011b). Hasta la fecha, se han llevado a cabo estudios en aguas profundas (Damare y Raghukumar 2008; Burgaud *et al.*, 2011), ambientes hipersalinos (Cantrell *et al.*, 2011), manglares (Purushothaman 2005), madera sumergida en descomposición (Pointing y Hyde 2000), esponjas (Wang 2008) y corales (Amend *et al.*, 2011), mientras que otros ambientes, como el de las fanerógamas marinas (Vohník *et al.*, 2015b), han sido poco estudiados.

Los hongos de la división *Ascomycota* son los predominantes en los ambientes marinos. La división *Basidiomycota* también está presente, pero en menor medida. Además existen otros grupos taxonómicos, pero no se tiene información suficiente sobre ellos (Burgaud *et al.*, 2011). El papel de los hongos en los ambientes marinos sigue siendo tema de análisis y debate. En el pasado, su función ecológica fue subestimada, incluso si los diferentes grupos ecofisiológicos crean comunidades que afectan a la supervivencia y productividad de los ecosistemas marinos. Están envueltos en el reciclaje de nutrientes, el flujo de energía y la síntesis de complejos húmicos de enzimas-exopolisacáridos e influyen en el ciclo de la materia orgánica disuelta (Damare y Raghukumar 2008; Luo *et al.*, 2005). Por tanto, además de beneficios directos o efectos adversos, los hongos pueden afectar a muchos procesos ambientales, en particular los asociados con la descomposición de materia orgánica, en especial los residuos de lignocelulosa (Hyde *et al.*, 1998).

Evolutivamente, las plantas requieren de la asociación con organismos especializados que favorecen su adaptación a ciertos nichos ecológicos, y a la vez, mantienen un crecimiento y desarrollo adecuado (Yuan *et al.*, 2010). Muchas especies fúngicas forman relaciones simbióticas con las raíces de las plantas y ocupan diferentes posiciones en el "continuo mutualismo-parasitismo" en función de las condiciones ambientales y edáficas (Jumpponen y Trappe, 1998). Estas arcaicas asociaciones son llamadas micorrizas (Smith y Read 2008), y jugaron un papel crucial en la colonización de la superficie terrestre por parte de las plantas vasculares (Selosse y Le Tacon 1998; Brundrett 2002). Representa una de las adaptaciones más interesantes para la absorción de nutrientes por parte de la planta, afectando en cierta magnitud al ciclo de los nutrientes en el suelo. (Read y Perez-Moreno 2003; Read *et al.* 2004). Las micorrizas tienen diferente anatomía, morfología, ecofisiología y distribución geográfica, aunque tiene una misma función (Read 1991). El carbono fluye desde las plantas fotoautótrofas hasta el hongo heterótrofo, mientras que el agua y los nutrientes fluyen en el sentido opuesto, aunque puede haber excepciones (Brundrett 2004). Este mutualismo requiere la existencia de una interfaz de cambio específica entre micobionte y el interior de la raíz (Peterson y Massicotte 2004). Se estima que aproximadamente existe un 86% de las especies de angiospermas tienen presentes hongos micorrícicos en sus raíces (Brundrett 2009), incluyendo plantas de agua dulce (Sondergaard

y Laegaard 1977; Sudová *et al.*, 2011) y salada (Radhika y Rodrigues 2007; Welsh *et al.*, 2010).

Por otro lado, no todas las plantas vasculares necesitan de hongos micorrícicos para la absorción de nutrientes, tales como plantas carnívoras, hidrófilos flotantes, haustorios y las plantas con raíces en racimo, etc. La mayoría de estas pertenecen al orden de las *Brassicales*, *Caryophyllales*, *Lamiales*, *Poales*, *Santanales* y también *Alismatales* orden que comprende a las fanerógamas marinas.

Las praderas marinas son un pequeño grupo taxonómico y ecológico de macrófitos sésiles marinos que evolucionaron, hace cien millones de años, a partir de las plantas terrestres (Les *et al.*, 1997). Estas fanerógamas comprende alrededor de sesenta especies distintas, que se han adaptado a la vida marina a través de la adquisición de varias características ecofisiológicas tales como el crecimiento clonal y la hidrófilia (Hemminga y Duarte 2000). Las praderas marinas son el 0,02% de todas las angiospermas, habitando en el 10% de la superficie del océano costero, forman parte de uno de los ecosistemas del mundo que más activamente secuestran CO₂ junto a manglares y marismas. Tanto es así que, ocupando una fracción mínima de la superficie terrestre, las fanerógamas marinas secuestran el 11% de las emisiones de CO₂ producidas por el ser humano (Nelleman *et al.*, 2009). Además ofrecen hábitat y refugio a una gran diversidad de organismos, por lo que las comunidades de fanerógamas marinas albergan complejas redes tróficas, que mantienen la alta biodiversidad marina a través de la combinación de roles tróficos y funcionales (Duarte, 2000).

Aunque por otra parte, estas praderas de fanerógamas presentan características morfológicas, fisiológicas y ecológicas que atenúan la posibilidad de albergar hongos micorrícicos. En primer lugar, toman los nutrientes a través de sus brotes y hojas, y por lo tanto, la absorción de nutrientes a través de las raíces es generalmente de menor importancia que en plantas terrestres (Hemminga *et al.*, 1991). Segundo, muchas especies poseen pelos absorbente en sus raíces, donde se desarrollan largos sistemas de aerénquima en el córtex (Kuo y McComb 1989). Se trata de un tejido especial que facilita el intercambio gaseoso, permitiendo los procesos aeróbicos en los órganos donde no se realiza la fotosíntesis (Salisbury y Ross, 1994), lugar donde se produce abundantemente la colonización micorrícica arbuscular (tipo de micorriza más común en las plantas terrestres) (Kuo y den Hartog 2007). Por ultimo algunas comunidades de fanerógamas marinas se asientan sobre suelos fangosos, con baja disponibilidad de oxígeno (Esteban-Muros *et al.*, 2012), que dificulta el desarrollo de micelios extradicales de muchos hongos micorrícicos (Nielsen *et al.* 1999).

Precisamente Nielsen *et al.* 1999 sostiene que las fanerógamas marinas carecen de simbiosis con micorrizas. Por otro lado, esto puede deberse a los pocos estudios realizados en comparación con otras plantas terrestres y acuáticas de agua dulce (Kothamasi *et al.*, 2006; Welsh *et al.*, 2010; Kohout *et al.*, 2012). Sin embargo, al igual que las plantas terrestres, las fanerógamas marinas albergan también hongos endófitos (Wilson 1998; Devarajan *et al.*, 2002; Sakayaroj *et al.*, 2010; Mata y Cebrián 2013; Vohník *et al.*, 2015a). Estos hongos son definidos como los micobiontes que viven en el interior de los tejidos de las plantas vivas, que carecen de interfaces localizadas o hifas especializadas para la transferencia de nutrientes, no sincronizan su desarrollo con de la planta y tampoco proporcionan beneficios nutricionales para la planta. El término micobiontes, tal como se usa aquí, es más general y puede referirse específicamente a las situaciones donde la función ecofisiológica del simbionte fúngico es aún desconocida (Brundrett 2006).

A pesar de que se trata de una especie de fanerógama marina presente en todo el Mar Mediterráneo, los hongos presentes en la *Posidonia oceanica* ha sido solo estudiado por poco autores. La primera publicación data de 1869, donde aparecen dos especies de hongos, *Sphaeria biturbinata* y *Sphaeria posidoniae*, en los rizomas de *Posidonia oceanica* (Durieu-de Maisonneuve y Montagne 1869). Pasado un siglo Kohlmeyer transfirió estos hongos en dos géneros nuevos *Halotthia* [con *Halotthia posidoniae* (Dur. Et Mont.) Kohlm.] y *Pontoporeia* [con *Pontoporeia biturbinata* (Dur. Et Mont.) Kohlm.] (Kohlmeyer 1963). Veinte años más tarde, Cuomo *et al.*, 1985 investigaron la micoflora de las hojas, rizomas y raíces de *P. oceanica* y encontraron siete especies de hongos lignícolas marinos. Estos hongos son *H. posidoniae* (presente en el 87 % de las muestras), *Corollospora maritima* Werdermann (70 %), *Papulaspora halima* Anastasiou (60 %), *P. biturbinata* (56 %), *Lulworthia* sp. (54 %), *Phoma* sp. (44 %), y *Corollospora intermedia* Schmidt (9 %). Un estudio de Kohlmeyer y Kohlmeyer 1979 rebeló una menor diversidad fúngica en comparación con la gramínea intermareal *Spartina alterniflora* (29 especies detectadas) y el manglar *Rhizophora mangle* (31 especies detectadas). Más recientemente, las asociaciones fúngicas con las hojas, rizomas, raíces y mata (parte muerta del rizoma) de *P. oceanica* fueron estudiadas por Panno *et al.*, 2013, quienes encontraron 88 especies en total, 14 de ellas presentes en las raíces. Curiosamente, ninguno de ellos coincide con los hongos encontrados por Cuomo *et al.*, 1985, siendo la mayoría especies de rápida esporulación, como los presentes en los hábitats terrestres. Esto es normalmente debido al antagonismo entre hongos. Otro reciente estudio, el publicado por Torta *et al.* 2015, solo consiguió aislar un hongo. Por ultimo, Vohník *et al.*, 2015b descubrió una asociación anatómica y morfológica entre hongos endófitos septados oscuros (DSE) y las raíces de *P.oceanica*, en 11 localidades del Mar Mediterraneo

Los DSE pertenecen al orden de los *Pleosporales*, poco se conoce de su ecología y de sus efectos en las plantas al colonizarlas. Algunos autores los han denominado “semi-micorrícicos” (Lingfei *et al.*, 2005), pues al parecer no ejercen efectos adversos en la salud de las plantas, por el contrario, algunos DSE como *Phialocephala fortinii* C.J.K.Wang & H.E.Wilcox y *Cadophora finlandica* T.C.Harr. & McNew incrementan las concentraciones de fósforo y nitrógeno en hojas (Saito *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2008; Upson *et al.*, 2009). Sin embargo, los efectos positivos, neutrales o negativos hacia la planta, al parecer dependen del genotipo vegetal y fúngico que se asocian y de la fertilidad del suelo (Schadt *et al.*, 2001; Kernaghan y Patriquin, 2011; Mandyam *et al.*, 2012; Mayerhofer *et al.*, 2013). Por otra parte, las interacciones de los DSE con otros microorganismos, como los hongos micorrícicos, han sido poco estudiadas.

Tradicionalmente el principal método de control de los hongos patógenos ha sido mediante el uso de fungicidas. El público evidencia un descontento con residuos de fungicidas en el follaje y frutos; asimismo, se percibe una animadversión de la población contra la aplicación de productos químicos que dañan al hombre y al ambiente. La tendencia gubernamental a legislar restricciones en el uso de plaguicidas ha incentivado investigaciones orientadas a proporcionar nuevas alternativas de control efectivas y que disminuyan los residuos de agrotóxicos, incorporando medidas de manejo cultural y biológico (Zhang *et al.*, 1994, Elad y Zimand 1991).

En este contexto, el antagonismo entre hongos, aparece como una alternativa viable la aplicación de un método biológico, especialmente diseñado como una estrategia dentro del concepto de manejo integrado de enfermedades. Numerosos estudios realizados en cultivos de albahaca, garbanzo, fresa, frambuesa, uva de mesa y vinífera, cebolla, tomate, bulbos de flores, especies de eucaliptos y píceas, han mostrado la efectividad del antagonismo entre

hongos como método control biológico sobre los hongos patógenos, y que en algunos casos ha sido superior que los fungicidas recomendados para el cultivo (Sanfuentes y Ferreira 1997, Zhang *et al.*, 1994, Esterio y Auger 1997, Peng y Sutton 1991, Elad *et al.*, 1994, Zhang *et al.*, 1996, Yu y Sutton 1997; Yu y Sutton 1999, Swadling y Jeffries 1995, Cole *et al.*, 2004, Chaves y Wang 2004).

El objetivo de este estudio es conocer la diversidad fúngica en simbiosis con las raíces de *P. oceanica*, con el fin de entender mejor función ecológica de los mismos y su posible aplicación biotecnológica, en aspectos agrícolas y forestales, como antagonistas de hongos patógenos.

Debido a los problemas mencionados previamente, como objetivo secundario de este estudio se trata de seleccionar los hongos, presentes en las raíces de *Posidonia oceanica*, con carácter antagonista contra los hongos patógenos, para ser empleados como método de control biológico tanto en el ámbito forestal como en la agricultura.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo de las raíces.

Las muestras de raíces de *P. oceanica* (L.) Delile fueron recolectadas mediante snorkel, durante los meses de Junio y Julio, en el Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar (Almería). La profundidad de recolección varió entre los 0,5 y 2 metros. El muestreo se realizó con una distancia de aproximadamente 1 metro entre las plantas seleccionadas. Se trató de elegir especímenes en todos los sustratos posibles, tales como arena, roca y la propia mata. La recolección se realizó en tres inmersiones, donde se recolectaron 15 muestras en cada una (45 en total). Cada muestra fue almacenada en recipientes de 100 mL esterilizados con agua del mar.

Aislamiento de los hongos endófitos en las raíces de *P.oceanica*.

El aislamiento de los hongos se llevó a cabo entre 2 y 5 días después de su recolección. Cada muestra fue higienizada con hipoclorito de sodio al 10% durante 30 segundos, seguidos de 2 lavados con agua destilada estéril para eliminar residuos. Las raíces fueron cortadas en segmentos de 1 cm de longitud. De cada muestra, se seleccionaron un total de 8 segmentos que fueron sembrados en una placa Petri a una distancia equidistante. El medio de cultivo utilizado fue Patata Dextrosa Agar (PDA) suplementado con NaCl (35 g/L) para ajustar la presión osmótica (Caye *et al.*, 1992). La incubación se llevo a cabo a temperatura ambiente, sin exposición directa del sol, durante 1-2 semanas.

Una vez incubadas las placas, se procedió al aislamiento de las colonias fúngicas mediante una lanceta tomando fragmentos de los distintos tipos morfológicos obtenidos y colocándolos en medio PDA suplementado o no con NaCl (35 g/L). Una vez obtenidas las colonias, se pudo comprobar que éstas eran capaces de crecer en medio PDA sin añadir cloruro sódico, lo que nos permitía proseguir con los ensayos.

Observación al microscopio.

La identificación de los distintos géneros se realizó de acuerdo a los distintos procedimientos macro y microscópicos.

Estudio de la capacidad antagonista

Las pruebas de antagonismo se realizaron en Patata Dextrosa Agar (PDA), colocándose en un extremo de la placa de Petri un disco de Agar de 0,5 mm de diámetro con micelio del hongo patógeno, y en el extremo opuesto otro disco de 0.5 mm con micelio del

hongo antagonista, a una distancia de 8 cm aproximadamente entre ellos (Howell, 2003). El antagonista se colocó en la placa 24 horas antes que el patógeno a temperatura ambiente; posteriormente, se incubaron bajo las mismas condiciones del antagonista durante 60 horas, haciéndose mediciones cada 12 horas del crecimiento radial del micelio de la colonia del hongo patógeno. Se realizaron 5 repeticiones para cada hongo antagonista, Para la toma de resultados se tomó el crecimiento radial del patógeno mediante regla. Se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en función del crecimiento del patógeno en solitario mediante la fórmula de Fokkema (1976). Para el análisis estadístico se realizó un análisis de la varianza ANOVA simple y separación de medias mediante el método LSD de Fisher ($p \leq 0,05$) (Fischer, 1925). Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.

EL calculo de la inhibición del crecimiento micelial del hongo patógeno se calculó mediante la medición de la distancia de crecimiento radial del micelio de la colonia del hongo patógeno enfrentado al hongos aislado de *P. oceanica* en comparación con el control (sin hongos aislados de *P. oceanica*). El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente formula (1):

$$(\%) = [(C-T) / C] 100 \quad (1)$$

Donde C es el máximo crecimiento del micelio del hongo patógeno en condiciones control y T es el crecimiento de micelio del hongo patógeno en presencia del hongo aislado de *P. oceánica*.

Como patógenos hemos seleccionado *Pythium aphanidermatum*, debido a que se trata de un especie con baja especificidad parasitaria, siendo capaz de atacar un gran número de especies vegetal además de ser capaces de parasitar animales marinos, como *Pythium thalassium* en *Pinnotheres* (MYCO-UAL 2016). *Pythium aphanidermatum* incluye diversas especies de hongos de suelo responsables del "damping-off" (ahogamiento o caída de plántulas, conocido también como peste de los semilleros), tanto antes como después de la emergencia de las plántulas. Muchos otros géneros de hongos y bacterias causan "damping-off" y podredumbres vegetales similares, aunque *Pythium* es el más agresivo (Messiaen *et al.*, 1995).

RESULTADOS

Las raíces fueron lavadas y seleccionadas para su análisis en medio PDA conteniendo 35 g L-1 de cloruro sódico. Una vez obtenidas las colonias, se pudo comprobar que éstas eran capaces de crecer en medio PDA sin añadir cloruro sódico, lo que nos permitía proseguir con los ensayos.

Identificación de los aislados de *P. oceanica*

De las 45 muestras se aislaron un total de 15 unidades taxonómicas (Figura 1). Se agruparon según sus características similares, y se seleccionaron las que presentaban un crecimiento más rápido. Los diferentes géneros/especies /familias identificados se muestran en la Figura 1.

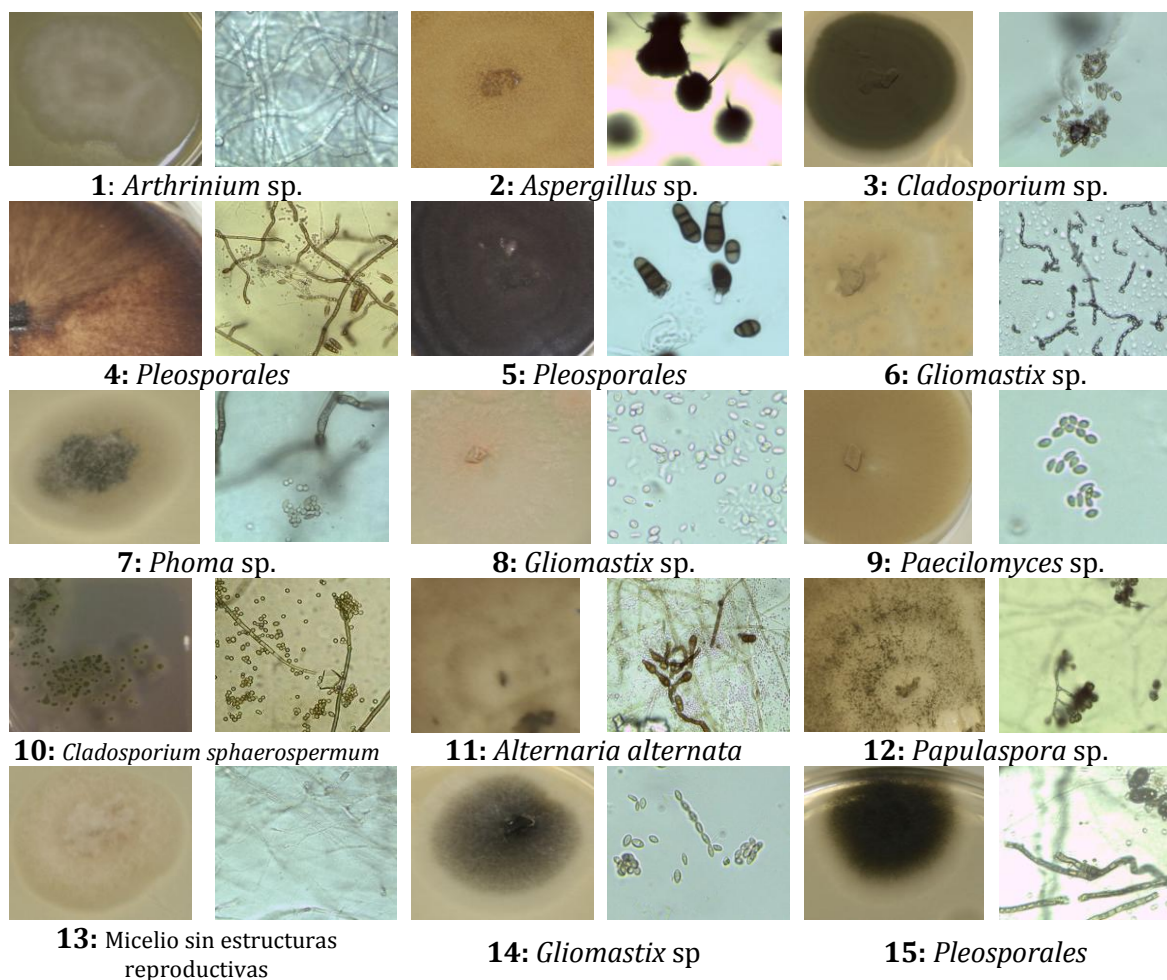
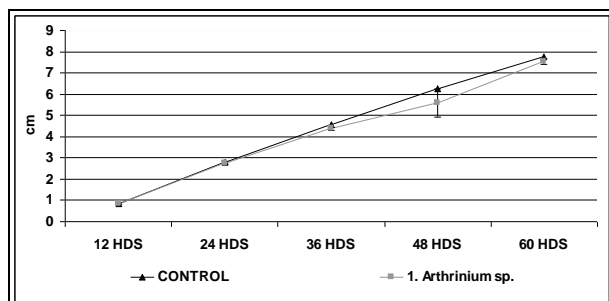


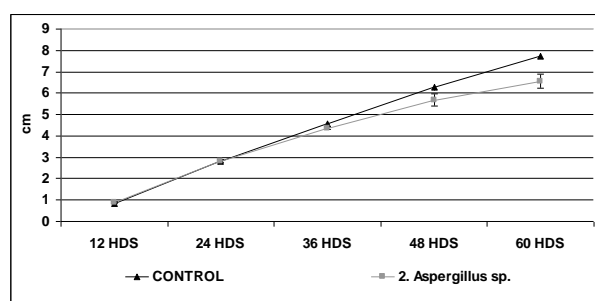
Figura 1. Crecimiento micelial a la izquierda e imagen microscópica a la derecha de los hongos aislados de las raíces de *Posidonia oceanica*. **1** Crecimiento micelial e hifas aéreas de *Arthrinium* sp. **2** Crecimiento micelial y conidióforo de *Aspergillus* sp. **3** Crecimiento micelial y racimo de conidios de *Cladosporium* sp. **4** Crecimiento micelial e hifas aéreas con conidióforos de *Pleosporales*. **5** Crecimiento micelial y conidios de *Pleosporales*. **6** Crecimiento micelial y conidios de *Gliomastix* sp. **7** Crecimiento micelial y conidios de *Phoma* sp. **8** Crecimiento micelial y conidios de *Gliomastix* sp. **9** Crecimiento micelial y conidios de *Paecilomyces* sp. **10** Crecimiento micelial y conidios de *Cladosporium sphaerospermum*. **11** Crecimiento micelial y conidióforo de *Alternaria alternata*. **12** Crecimiento micelial y conidióforo de *Papulaspora* sp. **13** Crecimiento micelial sin estructuras reproductivas. **14** Crecimiento micelial y racimo conidios de *Gliomastix* sp. **15** Crecimiento micelial e hifas aéreas de *Pleosporales*.

Evolución del crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* frente a los hongos aislados de *P.oceanica*

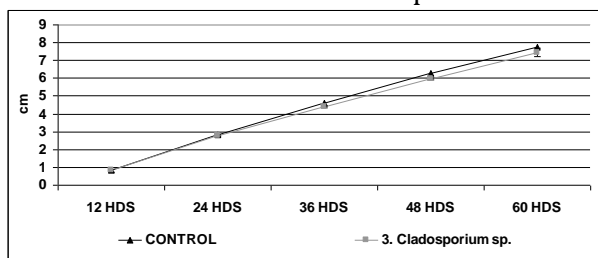
Los 15 hongos aislados fueron enfrentados a *Pythium aphanidermatum*, midiendo el crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* cada 12 HDS (Horas Después de la Siembra), en un total de 60 horas (Figura 2). También se realizó una muestra control, en la que solo estaba presente el hongo patógeno.



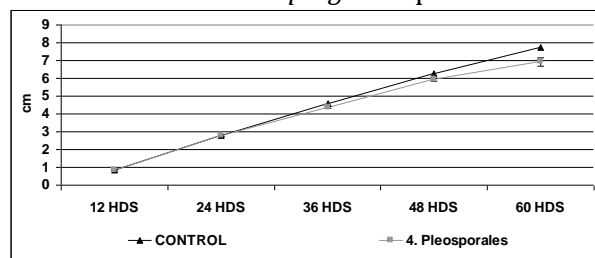
1: *Arthriniun* sp.



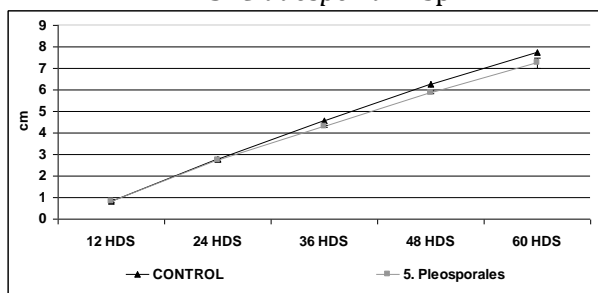
2: *Aspergillus* sp.



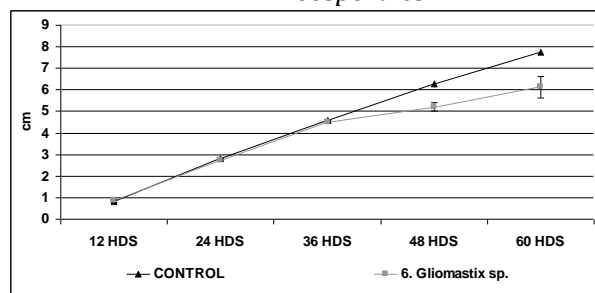
3: *Cladosporium* sp.



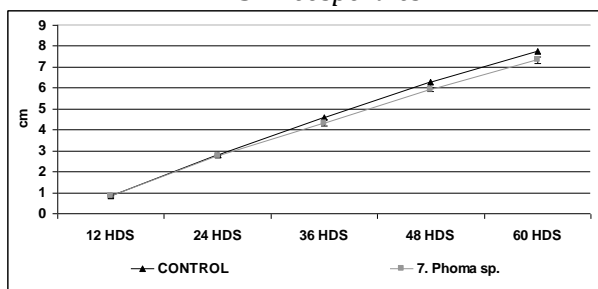
4: *Pleosporales*



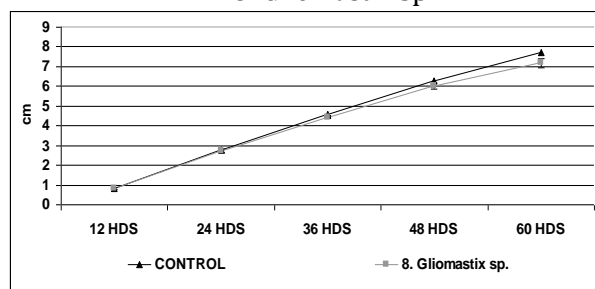
5: *Pleosporales*



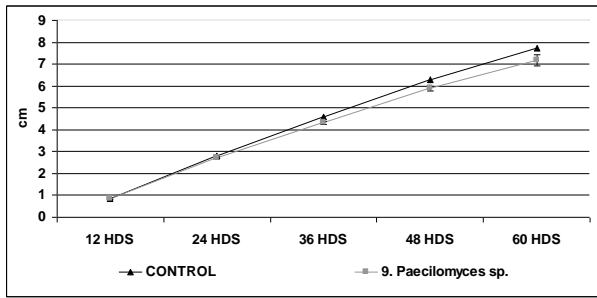
6: *Gliomastix* sp.



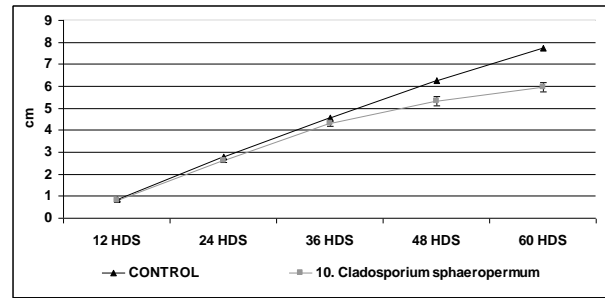
7: *Phoma* sp.



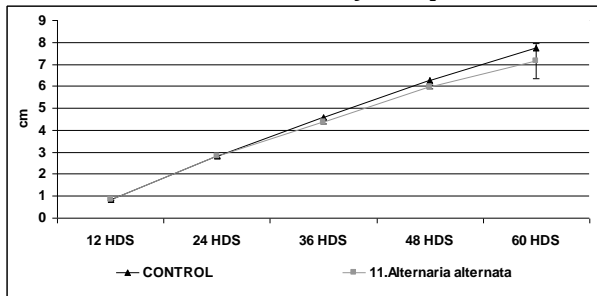
8: *Gliomastix* sp.



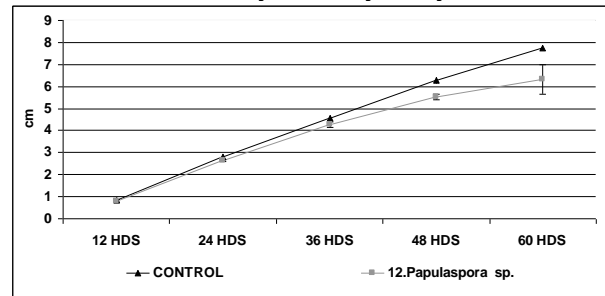
9: *Paecilomyces* sp.



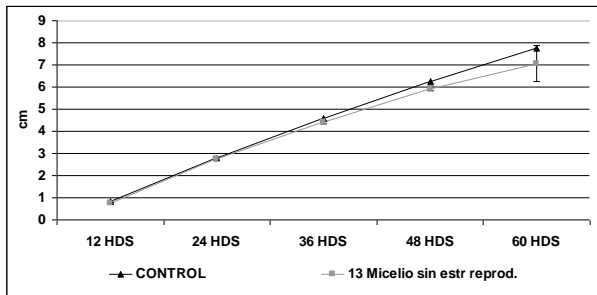
10: *Cladosporium sphaerospermum*



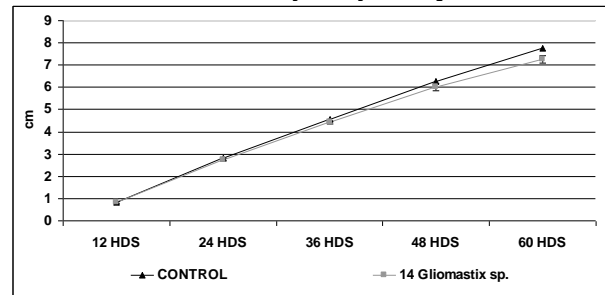
11: *Alternaria alternata*



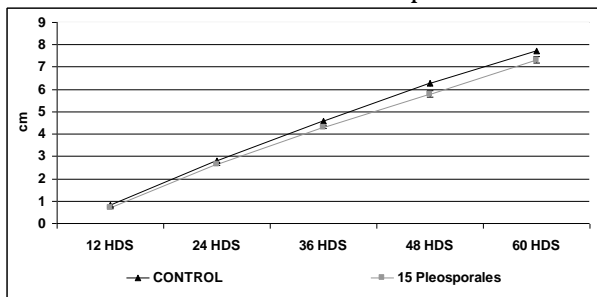
12: *Papulaspora* sp.



13: Micelio sin estructura reproductiva.



14: *Gliomastix* sp.



15: *Pleosporales*

En las Figura 2 Evolución crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* frente a los hongos aislados de *Posidonia oceanica*. **1** *Arthrinium* sp. **2** *Aspergillus* sp. **3** *Cladosporium* sp. **4** *Pleosporales*. **5** *Pleosporales*. **6** *Gliomastix* sp. **7** *Phoma* sp. **8** *Gliomastix* sp. **9** *Paecilomyces* sp. **10** *Cladosporium sphaerospermum*. **11** *Alternaria alternata*. **12** *Papulaspora* sp. **13** Micelio sin estructuras reproductivas. **14** *Gliomastix* sp. **15** *Pleosporales*.

Inhibición del crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* frente a los hongos aislados de las raíces de *P.oceanica*

En la Figura 3 se observa que frente a *Pythium aphanidermatum* el poder inhibitorio de los aislados de *P. oceanica* tiene diferencias significativas respecto al control, a excepción de *Arthrinium* sp. (1), *Cladosporium* sp. (3) y *Alternaria alternata* (11). El poder inhibitorio de los aislados de *P. oceanica* supera el 20% en uno de los casos de *Gliomastix* sp.(6), *Cladosporium sphaerospermum*(10) y *Papulaspora* sp.(12). Uno de los aislados de *Pleosporales* (4) y *Aspergillus* sp. (2), tiene un poder inhibitorio superior al 10%. El resto de los aislados (5, 7, 8, 9, 13, 14 y 15) tienen un escaso poder inhibitorio, inferior al 8%.

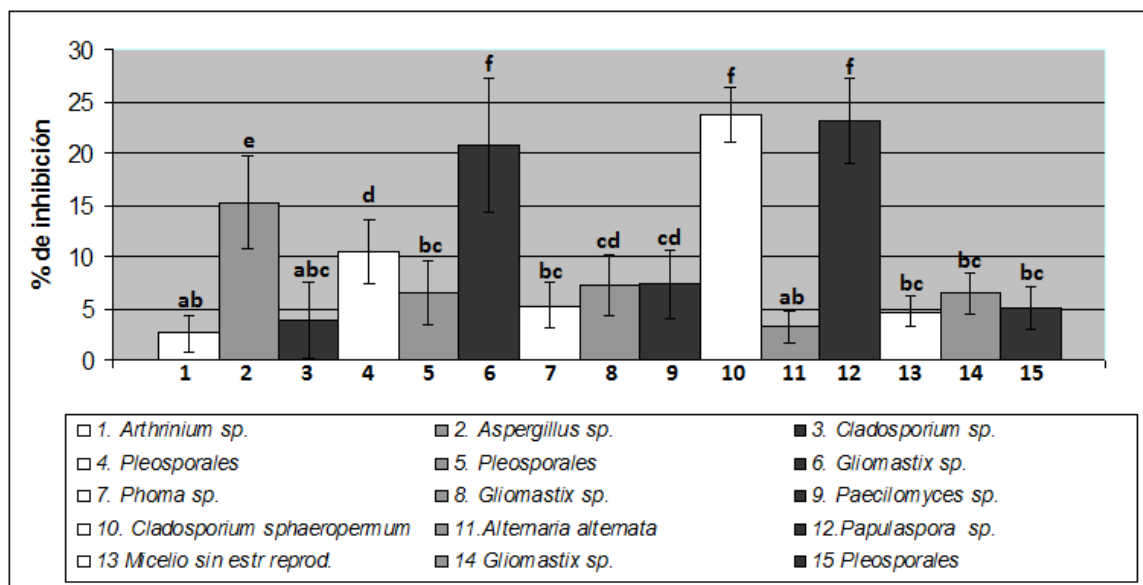


Figura 3. % de inhibición del crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* frente a los hongos aislados de *P.oceanica*. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre tratamientos según el test de ANOVA SIMPLE (método LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)).

DISCUSIÓN

Como se esperaba, todos los hongos aislados de las raíces de *P.oceanica* pertenecen a la división *Ascomycota* (Burgaud *et al.*, 2011). Coincidiendo con los presentes en esponjas, algas y otras fanerógamas, tales como *Suberites zeteki*, *Fucus serratus* y *Zostera marina* (Zuccaro *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008), y confirmando que esta división fúngica juega un rol importante en la descomposición de la materia orgánica y en diferentes interacciones con otros organismos (Burgaud *et al.*, 2011).

Según Vohnik *et al.*, 2015b y Torta *et al.*, 2015 el orden dominante en los aislados de las raíces de *P.oceanica* es *Pleosporales*, coincidiendo con los resultados obtenidos de nuestro estudio, siendo el orden con mayor número de aislados obtenidos (3 *Pleosporales* sp. y *Alternaria alternata*), aunque ambos autores no encontraron ninguno de los demás órdenes aislados por nosotros.

A excepción de los hongos *Paecilomyces* sp. ,*Papulaspora* sp. y *Phoma* sp. los demás hongos aislados de las raíces de *P. oceanica* (*Arthrinium* sp, *Aspergillus* sp. ,*Cladosporium* sp. *Cladosporium sphaerospermum*, *Alternaria alternata*, *Pleosporales*, *Gliomastix* sp y micelio sin estructuras reproductivas) también han sido obtenidos por Panno *et al.*, 2013. Mientras que

Cuomo *et al.*, 1985 si aísla los hongos *Papulaspora* sp. y *Phoma* sp, siendo el aislamiento de *Paecilomyces* sp. el único hongo que no coincide con los de otros autores. Por otra parte, ambos autores sostienen que todos los hongos a excepción de *Alternaria alternata* fueron aislados de otras partes de la planta, tal como rizomas, tallos y hojas senescentes, mientras que los hongos del orden *Pleosporales* fueron aislados de las raíces y del rizoma.

Algunos hongos (*Corollospora maritima*, *C. intermedia*, *Acremonium implicatum*, *Aspergillus versicolor*, *Candida zeylanoides*, *Cephalotrichum stemonitis*, *Cladosporium oxysporum*, *Penicillium brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. janczewsk*, *Schizophyllum commune* y *Torula herbarum*), han sido citados por otros autores (Cuomo *et al.*, 1985; Panno *et al.*, 2013) como asociados a las raíces de *P. oceanica*, y no han sido aislados en nuestro estudio. Esto puede ser debido a diferencias en las condiciones ambientales, fecha de recolección o procesos de higienización de las muestras recolectadas,

Los valores de crecimiento micelial obtenido en los distintos enfrentamientos fueron transformados en porcentajes medios de inhibición referidos respecto al crecimiento en las placas testigos. La inhibición del crecimiento micelial observada se produjo fundamentalmente por antibiosis y competencia. No se ha estudiado el micoparasitismo entre los distintos hongos.

Pythium aphanidermatum tiene un crecimiento muy rápido, y difícilmente se obtienen porcentaje de inhibición elevados, ya que no da tiempo a desarrollar los mecanismos de antibiosis por parte de los antagonistas. Es por ello, que estos deben ser puestos previos al patógeno.

Respecto al porcentaje de inhibición se observa que uno de los valores más altos corresponde para un aislado *Gliomastix* sp, mientras que existen diferencias significativas con los otros dos aislados del mismo hongo. Algo parecido pasa con los hongos del orden *Pleosporales*, siendo el de *Alternaria alternata* uno de los valores más bajos, mientras que uno de los tres aislados de *Pleosporales* presenta diferencias significativas con el resto, tendiendo un porcentaje de inhibición superior al 10%. Este hecho se da frecuentemente entre diferentes aislados del mismo género o especie. Por otro lado se observan valores bajos de porcentaje de inhibición para el aislado de *Paecilomyces* sp, coincidiendo con el estudio de (Ferrón-Sánchez *et al.*, 2013), que muestra porcentaje de inhibición para *Paecilomyces variotii* y *Tricochoderma saturnisporum* frente a *Pythium aphanidermatum* inferior al 7%. Aunque otro estudio realizado por Muthukumar *et al.*, 2011 obtuvo un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Pythium Aphanidermatum*, con *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum*, superior al 60%. Diferentes valores de inhibición son obtenidos por Diánez 2005, para *P. aphanidermatum* en los que la mayoría de los aislados presentan un porcentaje de inhibición entre 10 y 35%.

Por último, un estudio realizado por Khanfir Ben Jeana *et al.*, 2009, muestra que un compost realizado con una proporción *P. oceanica*, presenta una inhibición de hasta el 20%, coincidiendo con los valores obtenidos en nuestro estudio por los aislados de *Gliomastix* sp., *Cladosporium sphaerospermum* y *Papulaspora* sp.

Para concluir, se encontró que los conjuntos de hongos cultivables que colonizan las raíces de *P. oceanica* en nuestra área de estudio están compuestos por quince unidades taxonómicas, dominadas por el orden *Pleosporales*. La presencia regular de los hongos del orden *Pleosporales* en las raíces de *P. oceanica* a través del Mar Mediterráneo y su aparente estilo de vida intracelular indica una relación simbiótica no aleatoria con la fanerógama marina dominante en el Mediterráneo, lo que sin duda merece una mayor investigación.

El presente estudio también demuestra que el crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* se ve reducido en presencia de los hongos aislados por *P. oceanica*. Siendo los aislados de *Cladosporium sphaerospermum*, *Papulaspora* sp y uno de *Gliomastix* sp., los que presentan mayor porcentaje de inhibición.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias en primer lugar a mis tutores Mila y Fernando por darme la oportunidad de trabajar con ellos, por ayudarme en cada momento, por su dedicación, su interés, su paciencia, etc. Agradecer a los compañeros que me ayudaron a recoger las muestras para la realización del estudio. Y por último dar las gracias a mi familia, amigos y compañeros por el apoyo mostrado durante la realización del presente trabajo.

Bibliografía

Amend. A.S., Barshis, D.J., y Oliver, T.A. (2011). Coral-associated marine fungi from novel lineages and heterogeneous assemblages. ISME Journal 2011;6:1261–301

Brundrett, M.(2006). Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz B, Boyle C, Sieber TN (eds) Microbial root endophytes. Springer, Berlin

Brundrett, M.C. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytol 154:275–304

Brundrett, M.C. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. Biol Rev 79:473–495

Burgaud, G., Arzur, D., Durand, L., Cambon-Bonavita, M.A., y Barbier, G. (2011). Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna. Microbial Ecology; 73:121–33.

Cantrell, S.A., Casillas-Martinez, L., y Molina, M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular technique. A review. Mycological Research; 110:962–70

Caye, G., Bulard, C., Meinesz, A., y Loques, F. (1992). Dominant role of seawater osmotic pressure on germination in *Cymodocea nodosa*. Aquat Bot 42:187–193

Chaves, N., Wang, A. (2004). Combate del Moho Gris (*Botrytis cinerea*) de la Fresa mediante *Gliocladium roseum*. Agronomía Costarricense 28(2):73-85

Cole, M., Wiechel, T., Warren, M., y Holmes, R.(2004). Ensuring Optimal Quality Through Management Strategies For *Botrytis cinerea*. Department of Primary Industries. Monash University. Australian Government. 66 p.

Cuomo, V., Vanzanella, F., Fresi, E., Cinelli, F., y Mazzella, L. (1985). Fungal flora of *Posidonia oceanica* and its ecological significance. Trans Brit Mycol Soc 84:35–40

Damare, S., Raghukumar, C. (2008). Fungi and macroaggregation in deep-sea sediment. Microbial Ecology ;56:168–77.

Devarajan, P.T., Suryanarayanan, T.S., y Geetha, V. (2002) .Endophytic fungi associated with the tropical seagrass *Halophila ovalis* (Hydrocharitaceae). Indian J Mar Sci 31:73–74

Diáñez, F. (2005). Evaluación de la capacidad supresora de la microbiota bacteriana y fúngica del compost de orujo de vid frente a hongos fitopatógenos. Tesis Doctoral. Universidad de Almería

Duarte, C.M. (2000). Marine biodiversity and ecosystem services: an elusive link. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 250: 117–131.

Durieu-de Maisonneuve, C., Montagne, J.F.C. (1869). Pyrenomycetes Fr. In: Bory de Saint-Vincent J, Durieu de Maisonneuve C (eds) Exploration Scientifique de l'Algérie, Botanique

Elad, Y., Köhl, J., y Fokkema, N. (1994). Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. European J. Plant Path. 100:315-336.

- Elad, Y., Zimand, G. (1991). Experience in integrated chemical– biological control of grey mould (*Botrytis cinerea*). Contribution from the Agricultural Research Organization. Agriculture Volcanic Center. Bet Dagan, Israel 3274:195-199.
- Esteban-Muros, R., Giménez Morán, A., Díaz Almela, E. y De Stephanis, R. (2012). Manual didáctico para buceador experto en conservación de *Posidonia oceanica*. Proyecto LIFE09 NAT/ES/000534, Ed. CIRCE, Algeciras, 17-28.
- Esterio, M., Auger, J. (1997). *Botrytis*: nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Departamento de Sanidad Vegetal. 125 p.
- Ferrón-Sánchez, F. J., Santos-Hernández, M., Carretero-Esteban, y F.J. (2013). Identificación de potenciales agentes de control biológico y efectos de sus metabolitos producidos en el control de patógenos. Repositorio Institucional de la UAL. 200p.
- Fisher, R.A. (1925). Statistical methods for research workers. Oliver and Boyd, Edimburgh. UK. 269 pp.
- Fokkema, N.J. (1976). Antagonisms between fungal saprophytes and pathogens on aerial plant surfaces. In: CH Dickinson TF Preece (eds). Microbiology of aerial plant surfaces. Academic Press, London UK, pp. 487-505.
- Green, L.E., Porras-Alfaro, A., y Sinsabaugh R.L. (2008). Translocation of nitrogen and carbon integrates biotic crust and grass production in desert grassland. *Journal of Ecology* 96:1076-1085.
- Hemminga ,M.A., Duarte C.M. (2000). Seagrass ecology. Cambridge University Press, Cambridge
- Hemminga ,M.A., Harrison, P.G., y van Lent, F. (1991). The balance of nutrient losses and gains in seagrass meadows. *Mar Ecol Prog Ser* 71:85–96
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10
- Hyde, K. D., Jones, E.B.G., Leano, E., Pointing, S.B., Poonyth, A.D., y Vrijmoed, L.L.P. (1998). Role of marine fungi in marine ecosystems. *Biodiversity and Conservation*; 7: 1147–61.
- Jones, G. (2011a). Fifty years of marine mycology. *Fungal Diversity*;50:73–112.
- Jones, G. (2011b). Are there more fungi to be described. *Botanica Marina*; 54: 343–54
- Jumpponen, A., Trappe J.M. (1998). Dark septate root endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* 140:295-310.
- Kernaghan, G., Patriquin G. 2011. Host associations between fungal root endophytes and boreal trees. *Microbial Ecology* 62:460-473.
- Kohlmeyer, J. (1963). Zwei neue Ascomyceten-Gattungen auf *Posidonia*-Rhizomen. *Nova Hedwigia* 6:5–13
- Kohlmeyer, J., Kohlmeyer, E., (1979). Marine mycology—the higher fungi. Academic Press, New York
- Kohout, P., Sýkorová, Z., Čtvrtlíková, M., Rydlová, J., y Suda, J. (2012). Surprising spectra of root-associated fungi in submerged aquatic plants. *FEMS Microbiol Ecol* 80:216–235
- Kothamasi, D., Kothamasi, S., Bhattacharyya, A., Kuhad, R.C., y Babu, C.R. (2006). Arbuscular mycorrhizae and phosphate solubilising bacteria of the rhizosphere of the mangrove ecosystem of Great Nicobar Island, India. *Biol Fertil Soils* 42:358–361
- Kuo, J., den Hartog, C. (2007). Seagrass morphology, anatomy and ultrastructure. In: Larkum AWD, Orth RJ, Duarte CM (eds) *Seagrasses: biology, ecology and conservation*. Springer, Dordrecht
- Kuo, J., McComb, A.J. (1989). Seagrass taxonomy, structure and development. In: Larkum AWD, McComb AJ, Shepherd SA (eds) *Biology of seagrasses*. Elsevier, Amsterdam
- Les, D.H., Cleland, M.A., y Waycott, M. (1997). Phylogenetic studies in *Alismatidae*, II: evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophyly. *Syst Bot* 22:443–463

- Lingfei, L., Anna Y. y Zhiwei Z. (2005). Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in Southwest China. *FEMS Microbiology Ecology* 54:367- 373.
- Luo, W., Vrijmoed, L.L.P., y Jones, E.B.G. (2005) Screening of marine fungi for lignocellulose degrading enzyme activities. *Botanica Marina*; 48:379–86.
- Mandyam, K., Fox, C. y Jumpponen, A. (2012). Septate endophyte colonization and host responses of grasses and forbs native to a tallgrass prairie. *Mycorrhiza* 22:109-119.
- Mata, J.L., Cebrián, J. (2013). Fungal endophytes of the seagrasses *Halodule wrightii* and *Thalassia testudinum* in the north central Gulf of Mexico. *Bot Mar* 56:541–545
- Mayerhofer, M.S., Kernaghan, G. y Harper, K.A. (2013). The effects of fungal root endophytes on plant growth: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 23:119-128
- Messiaen, C. M., Blancard, D., Rouxe, F., y Lafon, R. (1995). Enfermedades de las hortalizas. Ed. Mundi-Prensa. 3ª edición. Madrid, España. 576 p.
- Muthukumar, A., Eswaran, A., y Sanjeevkumas, K. (2011). Exploitation of *Trichoderma* strains of the growth of *Pythium aphanidermatum* in Chilli. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 1598 – 1607.
- MYCO-UAL. (2016). www.ual.es/GruposInv/myco-ual/
- Nellemann, J., Corcoran, E., Duarte, C.M., Valdés, L., De Young, C., Fonseca, L. y Grimsditch, G. (2009). Blues Carbon. A rapid repose assesment. United Nations Enviroment Programe, GRID-Arendal.
- Nielsen. S.L., Thingstrup, I., y Wigand, C. (1999). Apparent lack of vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in the seagrasses *Zostera marina* L. and *Thalassia testudinum* Banks ex Konig. *Aquat Bot* 63:261–266
- Panno, L., Bruno M, Voyron S, Anastasi A, Gnani G (2013) Diversity, ecological role and potential biotechnological applications of marine fungi associated to the seagrass *Posidonia oceanica*. *N Biotechnol* 30:685–694
- Peng, G., Sutton, J. (1991). Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry. *Can. J. Plant Path.* 13:247-257
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B. (2004). Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Can J Bot* 82:1074–1088
- Pointing, S.B., Hyde, K.D. (2000). Lignocellulose-degrading marine fungi. *Biofouling*;15:221–9
- Purushothaman, A., Jayalaskshmi, S.(2005). Floral diversity: bacterial and fungi. In: Kathiresan K, Qasim SZ, editors. Biodiversity of mangrove ecosystems. New Delhi: Hindustan Pub.; p. 29–65
- Radhika, K.P., Rodrigues, B.F. (2007). Arbuscular mycorrhizae in association with aquatic and marshy plant species in Goa, India. *Aquat Bot* 86: 291–294
- Read, D.J. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47:376–391
- Read DJ, Leake JR, Perez-Moreno, J. (2004). Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Can J Bot* 82:1243–1263
- Read, D.J., Perez-Moreno, J. (2003). Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance? *New Phytol* 157:475– 492
- Saito. K., Kuga-Uetake, Y., Saito, M. y Peterson, R.L. (2006). Vacuolar localization of phosphorus in hyphae of *Phialocephala fortinii*, a dark septate fungal root endophyte. *Canadian Journal of Microbiology* 52:643-650.
- Sakayaroj, J., Preedanon, S., Supaphon, O., Jones, E.B.G., y Phongpaichit, S. (2010). Phylogenetic diversity of endophyte assemblages associated with the tropical seagrass *Enhalus acoroides* in Thailand. *Fungal Divers* 42:27–45
- Salisbury, F.B., Ross, C.W. (1994). Fisiología Vegetal. Ed. Iberoamericana.

- Sanfuentes, E., Ferreira, F. (1997). Avaliação de fungos para biocontrole de *Botrytis cinerea* em viveiros suspensos de eucalipto. *Revista Árvore* 21(1):147-153.
- Schadt, C.W., Mullen, R.B., y Schmidt S.K. (2001). Isolation and phylogenetic identification of a dark-septate fungus associated with the alpine plant *Ranunculus adoneus*. *New Phytologist* 150:747-755.
- Selosse, M.A., Le Tacon, F. (1998). The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends Ecol Evol* 13:15-20
- Smith, S.E., Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic, London
- Søndergaard, M., Laegaard, S. (1977). Vesicular-arbuscular mycorrhiza in some aquatic vascular plants. *Nature* 268:232-233
- Sudová, R., Rydlová, J., Čtvrtilíková, M., Havránek, P., y Adamec, L. (2011). The incidence of arbuscular mycorrhiza in two submerged Isoetes species. *Aquat Bot* 94:183-187
- Swadling, I., Jeffries, P. (1995). Isolation of Microbial Antagonists for Biocontrol Of Grey Mould Disease Of Strawberries. *Biocontrol Science and Technology* 6:125-136.
- Torta, L., Piccolo, S., Piazza, G., Burruano, S., y Colombo, P. (2015). *Lulwoana* sp., a dark septate endophyte in roots of *Posidonia oceanica* (L.) Delile seagrass. *Plant Biol* 17:505-511
- Upton, R., Read, D.J., y Newsham K.K. (2009). Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes. *Mycorrhiza* 20:1-11.
- Vohník, M., Borovec, O., y Kolařík, M. (2015b). Communities of Cultivable Root Mycobionts of the Seagrass *Posidonia oceanica* in the Northwest Mediterranean Sea Are Dominated by a Hitherto Undescribed Pleosporalean Dark Septate Endophyte. *Microb Ecol* DOI 10.1007/s00248-015-0640-5
- Vohník, M., Borovec, O., Župan, I., Vondrášek, D., Petrýl, y Sudová, R. (2015a). Anatomically and morphologically unique dark septate endophytic association in the roots of the Mediterranean endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *Mycorrhiza*. doi:10.1007/s00572- 015-0642-7
- Wang, G., Li, Q., y Zhu, P. (2008). Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian Sponge *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 93:163-74.
- Welsh, A.K., Burke, D.J., Hamerlynck, E.P., y Hahn, D. (2010). Seasonal analyses of arbuscular mycorrhizae, nitrogen-fixing bacteria and growth performance of the salt marsh grass *Spartina patens*. *Plant Soil* 330:251-266
- Wilson, W.L. (1998). Isolation of endophytes from seagrasses from Bermuda. MSc. thesis, University of New Brunswick. National Library of Canada, Ottawa
- Yu, H., Sutton, J. (1997). Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Can. J. Plant Path.* 19:237-246.
- Yu, H., Sutton, J. (1999). Density dynamic of *Gliocladium roseum* in relation to biological control of *Botrytis cinerea* in red raspberry. *Can. J. Plant Path.* 21:23-32.
- Yuan, Z. L., Zhang, C. L. y Lin, F.C. (2010). Role of diverse non-systemic fungal endophytes in plant performance and response to stress: progress and approaches. *Journal of Plant Growth Regulation* 29:116-126.
- Zhang, P. J., Sutton, A., y Hopkins, D. (1994). Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in container- grown black spruce seedlings. *Can. J. For. Res.* 24:1312-1316
- Zhang, P., Sutton, J., Tan, W., y Hopkins, A. (1996). *Gliocladium roseum* reduces physiological changes associated with infection of black spruce seedlings by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Plant Path.* 18:7-13.
- Zuccaro, A., Conrad, L., Spatafora, L.W., Kohlmeyer, J., Draeger, S., y Mitchell, J.I. (2008) Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 931-41.